

4. Чистякова А.А. Жизненные формы и их эколого-ценотическая обусловленность // Жизненные формы в экологии и систематике растений. Межвуз. сб. науч. труд. М.: МПГИ им. В.И. Ленина, 1986. С. 70-76.
5. Цыганов Д.Н. Экоморфы и экологические свиты // Бюлл. МОИП. Отд. биол. М., 1974. С. 128-141. Т. 79. Вып. 2.
6. Беляева И.В., Епачинцева О.В., Шаталина А.А., Семкина Л.В. Ивы Урала: атлас-определитель. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2006. 173 с.
7. Куликов П.В. Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения). Екатеринбург-Миасс: «Геотур», 2005. 537 с.
8. Рязанова Л.В. Конспект флоры степного юга Челябинской области. Челябинск: ЧГПУ, 2006. 445 с.
9. Серебрякова Т.И. Учение о жизненных формах растений на современном этапе. М., 1972. С. 84-149. Т. 1.
10. Цыганов Д.Н. Фитоиндикация экологических режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. М., 1983. 196 с.

Александр Германович СЕЛЮКОВ —
доцент кафедры зоологии и ихтиологии,
кандидат биологических наук

Екатерина Владимировна ЕФРЕМОВА —
аспирант кафедры зоологии и ихтиологии

Галина Николаевна БОНДАРЕНКО —
доцент кафедры зоологии и ихтиологии,
кандидат биологических наук
ags-bios@yandex.ru

Тюменский государственный университет

УДК 597:57.017.642:576.35

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ МУКСУНА COREGONUS MUKSUN (PALLAS)

CYTOMORPHOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF PRIMORDIAL GERM CELLS IN THE EMBRYOGENESIS OF MUKSUN COREGONUS MUKSUN (PALLAS)

АННОТАЦИЯ. В статье анализируются цитоморфологические преобразования первичных половых клеток (ППК) у эмбрионов муксуна. Утверждается, что эти преобразования являются составляющими специфического единого процесса пролиферации в период их миграции в область половых зачатков.

SUMMARY. Dynamics of cytomorphological transformation of primordial germ cells (PGCs) in mucksun embryos was analyzed. It is asserted that these transformations of PGC are constituent elements of specific single proliferation process during their migration towards the area of gonadal anlage.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Муксун, эмбриогенез, первичные половые клетки (ППК), пролиферация.

KEY WORDS. Mucksun, embryogenesis, primordial germ cells (PGCs), proliferation.

Полноценное формирование генеративной системы является важнейшим условием ее надежного и продолжительного функционирования. Познание закономерностей гаметогенеза в раннем онтогенезе животных позволяет предвидеть характер становления популяционной плодовитости, устойчивость и продуктивность вида. В этом процессе первичные половые (герминативные стволовые) клетки играют уникальную роль, обеспечивая преемственность поколений [1], [2], [3].

В основе первичной дифференциации клеток зародыша лежит ооплазматическая сегрегация яйцеклетки. В процессе дробления идентичные ядра оказываются в разнородном цитоплазматическом окружении, что определяет различный характер экспрессии генома и, в конечном счете, направление клеточной дифференцировки. Бластомеры, попадающие при дроблении в зону так называемой «зародышевой плазмы», развиваются в герминативном направлении. «Зародышевая плазма» рассматривается как специфический участок цитоплазмы яйцеклетки, содержащий факторы, детерминирующие развитие половых клеток [1]. В раннем онтогенезе многих животных, в том числе рыб (данио-рерио, медака и др.), в составе герминальных гранул найден белковый продукт гена *vasa* или его гомологов: РНК-хеликаза — один из ключевых детерминантов линии половых клеток [4], [5]. Так, удаление транскриптов гена *shiro-uovasa* (мРНК-содержащих точек) у белого бычка *Leucopsarion petersii* (Gobiidae) приводило к снижению числа ППК [6].

Проблеме происхождения половых клеток посвящены многочисленные исследования. Еще в 1880 г. М. Нуссбаум в эмбриогенезе форели отмечал экстрагонадное происхождение половых клеток, возникающих на ранних стадиях эмбрионального развития и мигрирующих в формирующиеся гонады [1]. Исследователи ППК в эмбриогенезе рыб отмечали различную конфигурацию их ядер — от многолопастной до округлой. Одни авторы ядерный полиморфизм описывали как начальный этап amitotического деления, другие характеризовали его как признак особого физиологического состояния клетки [7].

Такая широкая распространенность полиморфии ядер половых клеток ранних стадий развития заслуживает детального анализа этого явления и его соотношения с amitotической пролиферацией. Известно, что половые клетки и ранние бластомеры всегда делятся митозом [8], amitotическое деление ядер обычно наблюдается при патологиях. Так, amitozы превителлогенных ооцитов были выявлены при нарушениях оогенеза у сибирского осетра из сибирских рек — Енисей, Лена, Колыма [9].

Цель работы состояла в анализе цитоморфологических преобразований первичных половых клеток в эмбриогенезе муксуна, начиная с этапа пигментации глазных бокалов до вылупления.

Материал и методы исследования. В Сузгунском инкубационном цехе Абалакского рыбноводного завода (г. Тобольск) с февраля по апрель 2005 г. были зафиксированы эмбрионы муксуна от икры, полученной 6 ноября 2004 г. на Средней Оби (п. Томкатка). Температурный режим в инкубационных аппаратах соответствовал природному, изменяясь от 1,5 °С в начале ноября до 0,25-0,5 °С в декабре-апреле. Учитывали их возраст, выраженный в безразмерных единицах τ_0 [10].

Согласно ранее проведенным исследованиям [11], ППК в эмбриогенезе озерной пеляди выявлялись среди клеток спланхнотомов у 26-суточных зародышей (16,2 градусо-дней), на начальной стадии сомитогенеза. Несколько позже, в 34 суток часть клеток располагалась в области перибласта, а начало

их появления в герминативных гребнях отмечали в 68 суток. Наиболее отчетливое выявление этих клеток становится возможно с этапа пигментации глаз. В настоящей работе оценка морфологических показателей ППК была начата на данной стадии.

Проведен гистологический анализ 46 зародышей муксуна. После фиксации в смеси Буэна, проводки через спирты возрастающей концентрации и заливки в парафин серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм приготавливали на микротоме HM355S («Microm»). Анализ окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну [12] препаратов проводили на микроскопе «AxioImager A1» («Zeiss») с использованием видеокамеры AxioCam MRc5 и программного обеспечения AxioVision Release 4.7.1. Было проанализировано 2425 первичных половых клеток. Отмечали их локализацию, подсчитывали количество, изучали особенности структуры клеток и ядер и производили измерения и фотографирование. Ядерно-плазматическое соотношение определяли по формуле:

$$\frac{V_{\text{я}}}{V_{\text{кл}} - V_{\text{я}}} \times 100(\%)$$

пользованием электронных таблиц MS Excel (2005).

Результаты. ППК зародышей 95 суток находились в области зачатка гонад. Более четверти клеток характеризовались полиморфноядерностью (рис. 1, 2а); присутствовали многоядерные клетки (рис. 2б) и ППК в составе синцитиальных комплексов (рис. 2в), которые фрагментировались на отдельные половые клетки (рис. 2г). Количество ядрышек не превышало 2-3. Размеры ППК сравнительно небольшие (табл. 1); митозы встречались редко (рис. 1).

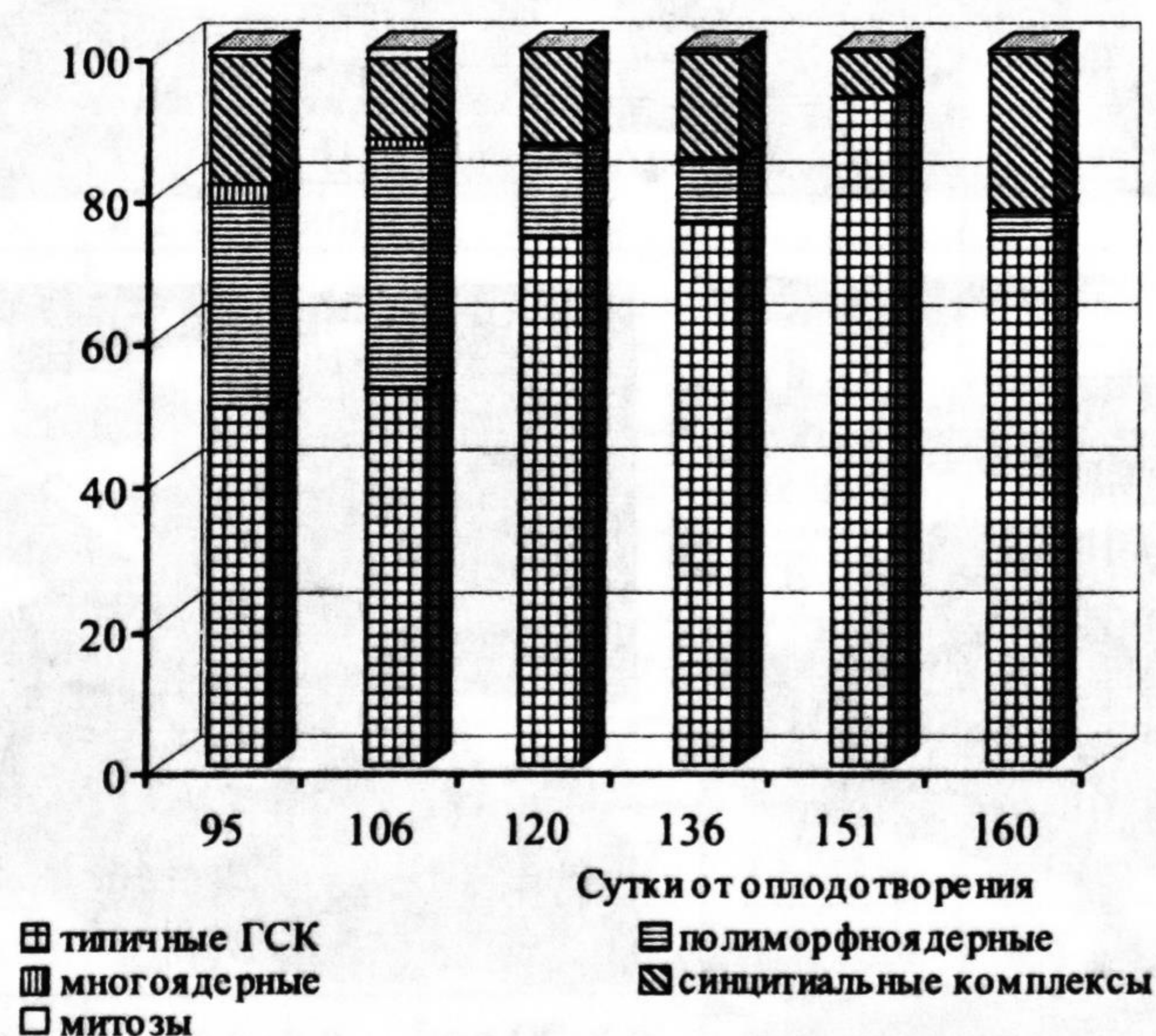


Рис. 1. Соотношение (%) первичных половых клеток разных состояний у эмбрионов муксуна

К 106 суткам количество ППК несколько увеличилось, при этом доля полиморфноядерных клеток значительно возросла, а число ППК в синцитиях сократилось. Размеры клетки снижались при неизменном диаметре ядра, что сопровождалось некоторым повышением ядерно-плазматического отношения (табл. 1).

* Использованное в работе оборудование приобретено за счет средств Инновационной образовательной программы Тюменского государственного университета (2007-2008 гг.).

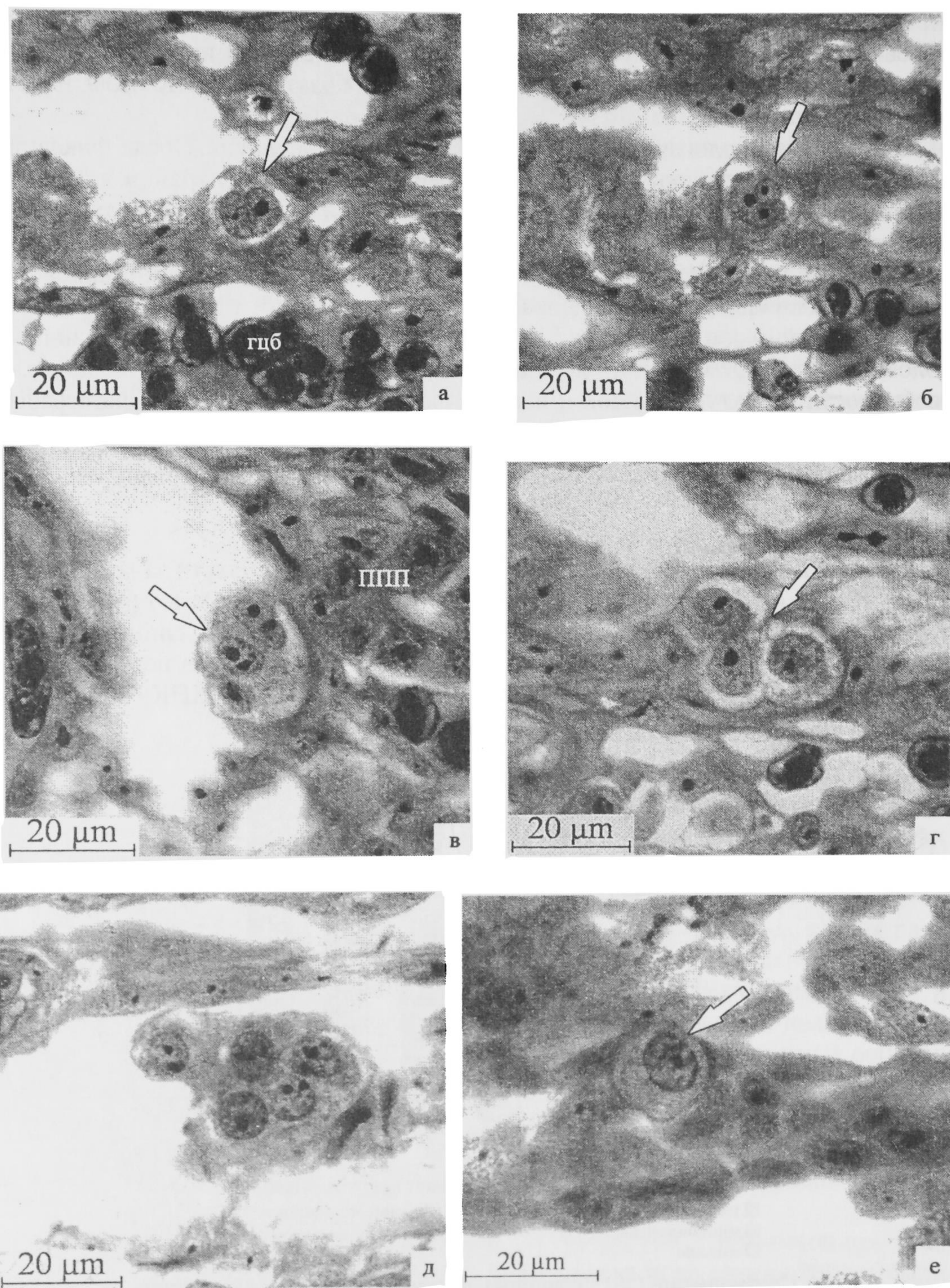


Рис. 2. Первичные половые клетки в эмбриогенезе мускуна
 а — полиморфноядерная ППК вблизи кровеносного сосуда с гемоцитобластами (гцб) (95 суток); б — преобразование полиморфноядерной ППК в трехъядерную (95 суток); в — трехъядерный синцитий перед началом фрагментации (стрелка) (95 суток), ППП — первично-почечные протоки;
 г — фрагментация синцития (стрелка) на отдельные ППК (95 суток);
 д — ППК в составе мигрирующего синцитиального комплекса (136 суток);
 е — ППК среди клеток полового зачатка на этапе вылупления (160 суток).

Через две недели (120 суток) количество ППК возросло, повысилось их число и в составе синцитиальных комплексов, но доля полиморфноядерных клеток сократилась (рис. 1). Размеры ядер и клеток увеличились.

К 136 суткам эмбрионального периода число половых клеток у зародышей муксуна увеличилось в еще большей степени (табл. 1), продолжала снижаться доля полиморфноядерных ППК, но усложнился состав синцитиальных образований (рис. 2д). Размеры клеток уменьшились, что вызвало некоторое увеличение ядерно-плазматического отношения.

На 151 сутки отмечено значительное сокращение половых клеток, резко снизились различные состояния ППК и возросла доля одиночно лежащих клеток (табл. 1). Их размеры несколько увеличились при оставшемся неизменным ядерно-плазматическом отношении.

На этапе вылупления установлено максимальное число ППК и четырехкратное их возрастание в составе синцитиальных комплексов. Вновь повысилась доля полиморфноядерных клеток, появились двухъядерные и митозы (рис. 1). Размеры ядер и клеток возросли незначительно, но их соотношение осталось прежним (табл. 1).

Таким образом, у эмбрионов муксуна количество и состав герминативных стволовых клеток характеризуются повышенной количественной и морфологической вариабельностью с тенденцией возрастания их численности к этапу вылупления.

Таблица 1

**Цитометрические показатели герминативных стволовых клеток
в эмбриогенезе муксуна***

Сутки после оплод-я	τ_{\dots}^{**} %	Общее число ППК в 1 эмбрионе	Число одиночных ППК	$D_{\text{ППК}}$, МКМ	$d_{\text{ядра}}$, МКМ	$\frac{V_{\text{я}}}{V_{\text{кл}} - V_{\text{я}}} \times 100(\%)$
95	194	$41,0 \pm 7,1$	$30,9 \pm 4,1$	$13,5 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,1$	$29,6 \pm 1,3$
	61	21–69	19–49	8,5–19,4	5,4–10,2	7,4–95,6
106	215	$44,7 \pm 4,8$	$38,9 \pm 4,3$	$12,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$32,9 \pm 1,1$
	67	29–68	27–57	7,6–18,4	5,3–14,1	6,6–98,5
120	242	$51,4 \pm 7,9$	$44,2 \pm 6,7$	$13,8 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,04$	$31,5 \pm 0,8$
	76	28–83	24–72	8,2–18,8	6,4–10,2	9,9–94
136	273	$56,1 \pm 14,4$	$44,3 \pm 10,7$	$13,7 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,04$	$27,9 \pm 0,6$
	86	11–114	11–93	9,7–18,4	6,4–9,4	11,9–68,3
151	302	$48,9 \pm 7,8$	$44,5 \pm 5,9$	$14,4 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,03$	$29,3 \pm 0,6$
	95	26–93	26–73	10,7–19,2	7,3–10,1	9–68,7
160 (вылуп- ление)	319	$68,2 \pm 7,7$	$49,6 \pm 5,4$	$15,2 \pm 0,1$	$9,1 \pm 0,1$	$29,0 \pm 0,7$
	100	28–102	24–71	11,4–18,8	7,2–11,0	12,1–66,2

* Число эмбрионов на каждую дату 7-10 экз.

** τ — продолжительность развития с момента оплодотворения, приведенное в τ_0 .

***% — в % от продолжительности эмбрионального периода.

Обсуждение. Муксун — монотипичный длинноцикловый представитель сиговых рыб с третьим типом нерестового стада. Созревание каждой генерации этого вида варьирует от 8+ до 13+. Нерестовое стадо состоит из ряда поколений, каждое из которых представлено сравнительно небольшой долей нерестящихся в конкретном году особей. При этом большая часть генерации половой зрелости еще не достигла или пропускает нерест, составляя резерв нерестового стада. Индивидуальная абсолютная плодовитость варьирует от 20 тыс. до 167 тыс. икринок [13]. Продолжительные восстановительные процессы в гонадах и пополнение оогониального фонда удлиняют овариальные циклы до 2–3 лет [14].

При проведении исследований зародышей муксуна во вторую половину эмбрионального периода выявились значительные цитоморфологические преобразования ППК. Динамика одиночных, полиморфноядерных, двух- и многоядерных ППК, синцитиальных структур из 2–3 и большего числа клеток позволяет предположить преемственность этих состояний: полиморфноядерность ППК предшествует их количественному росту, совпадающему с возрастанием числа ядер в синцитиях, на последующих этапах пролиферации трансформирующихся в отдельно лежащие ППК с их типичными характеристиками [7], [15]. При этом следует особо отметить крайне редкую встречаемость митозов. Если придерживаться классической схемы пополнения половых клеток за счет митотических делений, трудно объяснить высокую флуктуацию их численности.

Полученные нами данные позволяют предположить пролиферативную активность иного вида, более свойственную ряду соматических клеток. Так, конкуренция предмитотического и тканеспецифического синтеза в условиях совмещения пролиферации и дифференцировки приводит к неполному митозу, выпадению его конечных фаз и полиплоидизации [16]. Не исключено, что именно этот путь проходят ППК при совпадении процессов миграции к месту закладки гонад и пролиферации, когда после редупликации ДНК реализуется незавершенный, полиплоидизирующий митоз, ведущий к появлению многоядерных синцитиальных комплексов. К моменту вылупления у муксуна резко повышается число синцитиальных структур, что можно объяснить началом очередного цикла полиплоидизации с последующей фрагментацией на отдельные ППК.

Причина снижения числа ППК может заключаться в актуализации молекулярных механизмов, избавляющих первичные половые клетки от накопившегося груза мутаций. У обладавших высокой плодовитостью и сохраняющих видоспецифическую ритмичность размножения рыб, для непрерывного обновления линии половых клеток необходимо сохранять неповрежденную интактную ДНК для передачи полноценного генома последующим поколениям в большом количестве клеток. Поскольку ППК характеризуются митотическим делением, им присущи свойственные всем стволовым клеткам пути сохранения генома — посредством асимметричной пролиферации [17].

Как нами показано, число ППК в эмбриогенезе муксуна возрастало или снижалось на фоне их повышенной трансформационной активности. Причиной ненакопления ППК может быть переход части этих клеток в покоящееся состояние и приобретение внешнего сходства с окружающими соматическими клетками гонады [18]. Такая особенность соматической клетки рассматривается в качестве средства сохранения пролиферативного потенциала для обеспечения в случае необходимости быстрой репопуляции клеточной системы [19]. Покоящиеся клетки с их особым типом метаболизма являются важным элементом

организации многих тканей, в которых приток новых клеточных элементов осуществляется за счет деления стволовых клеток.

Выводы

1. В эмбриональный период муксуна при формировании линии половых клеток чередуются ядерный полиморфизм, многоядерность и синцитиальные образования, что может быть причиной преимущества этих структур и реализует особый тип пролиферации первичных половых (герминативных стволовых) клеток периода миграции в половые зачатки.

2. Численность ППК в эмбриогенезе муксуна флуктуирует, а их пополнение постоянно осуществляется за счет пролиферации, что нами рассматривается в качестве способа формирования исходного фонда половых клеток, необходимого для увеличения резерва индивидуальной плодовитости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенштадт Т.Б. Цитология оогенеза. М.: Наука, 1984. 247 с.
2. Donovan, P.J. The germ cell — the mother of all stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* 1998. Vol. 42. P. 1043-1050.
3. Wylie, C.C. Germ cells // *Cell*. 1999. V. 96. P. 165-174.
4. Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells // *Development*. 1997. Vol. 124. P. 3157-3165.
5. Bratt, A.K., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D. Germ line development in fishes // *Int. J. Develop. Biol.* 1999. Vol. 43. P. 745-760.
6. Miyake, A., Saito, T., Kashiwagi, T. et al. Cloning and pattern of expression of the shiro-uo vasa gene during embryogenesis and its roles in PGC development // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. Vol. 50. № 7. P. 619-625.
7. Персов Г.М. Дифференцировка пола у рыб. Л.: Изд-во Ленинградского университета. 1975. 148с.
8. Михайлов В.П. Амитоз, эндомитоз // Введение в цитологию. Л.: Медицина. 1968. С. 163-171.
9. Акимова Н.В., Рубан Г.И. Систематизация нарушений воспроизводства осетровых (*Acipenseridae*) при антропогенном воздействии // *Вопросы ихтиологии*. 1996. Т. 36. № 1. С. 65-80.
10. Детлаф Т.А. Безразмерные критерии как метод количественной характеристики развития животных // *Математическая биология развития*. М.: Наука, 1982. С. 25-39.
11. Бондаренко О.М. Формирование генеративной системы и ее модификация экологическими факторами в раннем онтогенезе сиговых и осетровых рыб: Дисс. ... канд. биол. наук. Тюмень: ТюмГУ. 2003. 189 с.
12. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература. 1953. 718 с.
13. Атлас пресноводных рыб России / Под ред. Ю.С. Решетникова. М.: Наука, 2003. Т. I. 379 с.
14. Селюков А.Г. Репродуктивная система сиговых рыб (*Coregonidae*, *Salmoniformes*) как индикатор состояния экосистемы Оби. II. Половые циклы муксуна *Coregonus muksun* // *Вопр. ихтиологии*. 2002. Т. 42. № 2. С. 225-235.
15. Селюков А.Г. Ранний гаметогенез пеляди *Coregonus peled* (Gmelin) // *Вестник Ленинградского университета. Биология*. 1985. № 17. С. 26-32.
16. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Проллиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981. 243 с.
17. Терских В.В., Васильев А.В., Воротеляк Е.А. Самоподдержание стволовых клеток: роль асимметричного деления // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2009. № 5. С. 509-514.
18. Everett, N. The present status of the germ cell problem in vertebrates // *Biol. Nev. Cambr. Phil. Soc.* 1945. Vol. 20. № 1. P. 45-55.
19. Елифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.В. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме. М.: Наука, 1983. 176 с.